

8

Nouveaux immunogènes coquelucheux

Les premières descriptions de la coqueluche datent du début du XVI^e siècle. En 1900, Bordet et Gengou découvrent l'agent causal, la bactérie *Bordetella pertussis* qu'ils réussissent à isoler en 1906 (Bordet et Gengou, 1906). Très rapidement, des vaccins ont été mis au point pour lutter contre cette maladie très contagieuse et gravissime chez les nourrissons. Les premiers vaccins étaient constitués par des suspensions bactériennes inactivées. Les premières études sont très difficiles à interpréter en raison des différences dans les conditions de fabrication des vaccins et entre les lots eux-mêmes. L'utilisation de modèles animaux permet de standardiser ces conditions. Les vaccins « germes entiers » ont été utilisés en routine à partir des années cinquante.

Parallèlement à ce développement des vaccins coquelucheux « germes entiers », des toxines bactériennes furent identifiées comme responsables des symptômes observés au cours d'autres maladies, tels le tétanos ou la diphtérie. Il fut rapidement démontré que la vaccination avec ces toxines inactivées conférait une protection. De ce fait, des recherches furent entreprises pour mettre en évidence une toxine exprimée par *B. pertussis* qui pourrait être responsable des symptômes observés lors de la coqueluche. Ces recherches furent stimulées par le fait que l'efficacité de certains vaccins coquelucheux « germes entiers » fut mise en cause (Fine et Clarkson, 1987 ; Romanus et coll., 1987) et que ces vaccins induisaient des effets secondaires (Cody et coll., 1981).

Un très grand nombre de recherches sur la bactérie furent alors entreprises pour remplacer le vaccin « germes entiers » par des vaccins composés de protéines purifiées au moins aussi efficaces et n'induisant pas d'effets secondaires. Des modèles animaux et des modèles cellulaires ont été mis au point, des mutants de la bactérie ont été construits. Ainsi, des protéines impliquées dans la pathogénicité de la bactérie ont pu être caractérisées, purifiées, leurs gènes de structure séquencés et leurs propriétés étudiées. Le résultat de ces recherches a permis de mettre au point différents vaccins dits « acellulaires » composés d'une à cinq protéines purifiées.

L'objectif de ce chapitre est de décrire *B. pertussis* et les protéines impliquées dans la pathogénicité de cette bactérie, les modèles animaux qui ont conduit

au choix des protéines bactériennes qui composent les vaccins acellulaires, ainsi que les problèmes qui restent à résoudre.

Isolement, identification et culture de *Bordetella pertussis*

B. pertussis est un coccobacille Gram négatif difficile à isoler et à cultiver. Deux milieux de culture sont couramment utilisés dans le monde avec une sensibilité comparable : le milieu de Bordet-Gengou préparé à partir d'infusion de pommes de terre, et le milieu de Reagan-Lowe contenant du charbon. Sur le milieu de Bordet-Gengou, les colonies bactériennes sont lisses, brillantes et hémolytiques. Ces caractéristiques sont celles de bactéries appelées phase I. Elles sont observées quand les isolats sont obtenus à partir de prélèvements frais provenant de malades atteints de coqueluche en phase précoce. Dans des conditions moins favorables (température, milieu différent...), après de nombreux repiquages ou lorsque le prélèvement est effectué longtemps après le début des symptômes, les bactéries ont un phénotype différent. Les colonies sont alors soit toujours brillantes et lisses mais non hémolytiques (phase II), soit plus larges, plates, blanchâtres et non hémolytiques (phase III ou phase IV). On sait maintenant que ces différentes phases sont dues à une expression différentielle de certaines protéines, en particulier des toxines et des adhésines.

Malgré une connaissance beaucoup plus grande de cette bactérie, elle est toujours très difficile à cultiver et, pour résumer, on peut citer la phrase de Parker : « *Different lots of vaccine, made in the same way, from the same strains, sometimes show different properties. Vaccine strains and laboratory passaged strains have different properties than fresh isolates and may be referred as intermediate strains. One man Bordet Gengou is NOT that of another man.* » (Parker, 1980). En 1988, Stainer mentionnait toujours le fait qu'on ne savait pas quelles étaient les souches et les conditions de culture nécessaires pour la production d'un vaccin efficace (Stainer, 1988). Les conditions d'isolement et d'identification de *B. pertussis* ont été remises au point lors de récents essais cliniques qui ont eu lieu entre 1989 et 1995. Elles ont été résumées lors du congrès de Rome en 1995 (Guiso, 1997).

Polymorphisme des isolats de *Bordetella pertussis*

Indépendamment des problèmes de culture de la bactérie et de l'expression différentielle des protéines de la membrane externe en fonction de l'environnement *in vivo* ou *in vitro*, l'hétérogénéité des isolats de *B. pertussis* a été signalée dès l'isolement de cette bactérie (Brown, 1959 ; Cameron, 1967 ; Goldman et coll., 1984 ; Fine et Clarkson, 1987).

Musser et coll. (1986), analysant le polymorphisme avec la technique de *Multilocus enzyme electrophoresis* (analyse de la migration électrophorétique d'une quinzaine d'enzymes), ne trouvaient qu'une variation très limitée. Arico et coll. (1987) montraient que la toxine de pertussis, synthétisée par la souche de référence OMS (souche 18 323), était antigéniquement différente de celle synthétisée par des isolats circulants. Par l'analyse du chromosome de différents isolats par la technique d'électrophorèse en champ pulsé, Khattak et coll. montrèrent que des isolats anglais étaient différents entre eux ainsi que de la souche 18 323 (Khattak et coll., 1992 ; Khattak et Matthews, 1993a et b). En 1995, l'équipe de Guiso montrait, avec la même technique de typage, que la souche 18 323 et la souche japonaise Tohama étaient différentes des isolats circulant en France et que, parmi les hypothèses qui pouvaient être émises concernant la mauvaise efficacité du vaccin « germes entiers » Connaught, il y avait soit un problème de conditions de fabrication, soit une différence antigénique entre les souches vaccinales et les isolats circulants (Guiso, 1997). De nombreuses autres analyses ont montré que les souches ne sont pas toutes identiques. En particulier, les souches circulant actuellement aux Pays-Bas synthétisent une pertactine différente de celle exprimée par les souches vaccinales (Van der Zee et coll., 1996). Des isolats semblables ont été collectés en France (Boursaux-Eude et coll., 1999). D'autres analyses sont en cours pour savoir si ces différences sont responsables de la mauvaise efficacité de certains vaccins.

Modèles animaux d'infection à *Bordetella pertussis*

La coqueluche est une maladie strictement humaine, donc aucun modèle animal ne peut réellement reproduire la maladie. Cependant, dès la découverte de la bactérie, beaucoup d'efforts ont été faits pour mettre au point des modèles utilisant le singe, le lapin, le rat ou la souris (Sato, 1988). Les jeunes singes sont capables de développer une toux paroxystique et une lymphocytose après infection (deux caractéristiques de la maladie humaine) et de développer une immunité humorale semblable à celle observée chez des patients atteints de coqueluche. Pour des raisons évidentes, ce sont plutôt lapins, rats et souris qui ont été utilisés en routine. Les lapins infectés développent peu de symptômes, mais cela est vraisemblablement dû au fait qu'ils sont souvent infectés par la bordetelle animale, *B. bronchiseptica*. Les rats peuvent être infectés et la toux a pu être reproduite chez ces animaux après injection intratrachéale d'une suspension de *B. pertussis* dans de l'agar (Woods et coll., 1989). Mais, en raison de sa difficulté, ce modèle ne peut être utilisé en routine.

Les modèles d'infection chez la souris ont donc été principalement utilisés. Les premiers modèles ont été mis au point pour standardiser la production de vaccins « germes entiers » et essayer de déterminer leur efficacité vaccinale.

Les souris peuvent être infectées par voie intracérébrale (IC), par voie intrapéritonéale (IP), par aérosols (AE) ou par voie intranasale (IN). Une corrélation entre les résultats d'efficacité obtenus avec le modèle murin IC de Kendrick (Kendrick et coll., 1947) et ceux obtenus lors d'essais cliniques (Standfast, 1958) ayant été observée, ce modèle IC a été choisi par l'OMS pour mesurer l'efficacité des vaccins coquelucheux et continue à être utilisé. Cependant, les modèles IN et AE ont été reconsidérés pour plusieurs raisons :

- Le modèle IC ne reproduit pas les symptômes cliniques observés lors de la maladie humaine et est très difficile à réaliser.
- Il a été montré lors des récents essais cliniques, que les vaccins « germes entiers » ont une efficacité variable (Greco et coll., 1996 ; Gustafsson et coll., 1996 ; Schmitt et coll., 1996 ; Olin et coll., 1997 ; Simondon et coll., 1997) , or ils avaient tous été considérés comme efficaces avec le modèle IC de référence.
- L'isolat de *B. pertussis* utilisé dans le modèle IC est le plus virulent que Kendrick et coll. avaient à leur disposition. Cet isolat est devenu la souche de référence 18 323, dont on sait maintenant qu'elle est antigéniquement très différente des isolats circulant à l'époque et maintenant (Arico et coll., 1987 ; Grimprel et coll., 1996 ; Boursaux-Eude et coll., 1999).

Il s'avère que les modèles IN et AE reproduisent une grande partie des symptômes observés lors de la maladie humaine. En effet, on observe une sensibilité à la maladie en fonction de l'âge de l'animal, une lymphocytose, une destruction des cellules ciliées de l'appareil respiratoire, une infection limitée à l'appareil respiratoire et le développement d'une immunité humorale et cellulaire. Cependant, ni la transmission ni la toux ne peuvent être reproduites dans ces modèles.

Toutefois, il faut souligner que la reproductibilité d'un modèle animal dépend beaucoup de la reproductibilité des conditions de croissance de la souche 18 323, ou de l'isolat choisi pour réaliser l'épreuve létale ou sublétale. En effet, l'équipe de Guiso a montré en 1990 que l'expression de la toxine de pertussis et de l'adényl cyclase-hémolysine est plus importante si la souche de référence 18 323 est isolée directement à partir d'un poumon de souris infectée, que si elle est cultivée *in vitro*, et qu'elle persiste plus longtemps chez l'animal (Guiso et coll., 1989 ; Gueirard et coll., 1998).

Jusqu'à présent, les résultats obtenus avec le modèle IN n'avaient jamais été corrélés avec ceux obtenus lors d'essais cliniques. C'est maintenant chose faite : la différence d'efficacité observée entre les vaccins acellulaires lors des derniers essais cliniques italiens et suédois a été reproduite dans le modèle IN (Guiso et coll., 1999).

Déterminants de la virulence de *Bordetella pertussis*

La coqueluche peut être très schématiquement définie comme l'association d'un syndrome infectieux et d'un syndrome toxinique. Le syndrome infectieux reste limité à l'épithélium bronchique et comporte une colonisation facilitée par l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales, suivie d'une multiplication bactérienne locale. Le rôle des adhésines est ici prépondérant. Le syndrome toxinique est secondaire à l'implantation bactérienne et comporte des manifestations locales à type de destruction et élimination des cellules ciliées, accumulation de mucus par paralysie du système d'épuration ciliaire et réaction inflammatoire. Les effets systémiques sont limités à l'hyperlymphocytose.

De très nombreux travaux ont été effectués afin de caractériser les toxines et les adhésines impliquées dans les syndromes infectieux et toxiques. Dans les années soixante-soixante-dix, des recherches ont été réalisées sur les protéines ayant une activité hémagglutinante. C'est en 1976 qu'une distinction fut faite entre les deux protéines ayant une activité hémagglutinante, l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) et la toxine de pertussis (PT) (Arai et Sato, 1976). C'est en 1978, lors du *Third international symposium on pertussis*, qu'il fut suggéré que la PT était la toxine responsable des effets biologiques observés lors de la coqueluche (Pittman, 1979). Depuis cette époque, la majorité des recherches a porté sur la FHA et la PT, tenant un peu à l'écart les autres protéines de membrane externe, dont on s'aperçoit maintenant qu'elles pourraient jouer un rôle important au cours de la maladie.

Adhésines

Quatre adhésines de *B. pertussis* sont maintenant utilisées seules ou en association comme antigènes vaccinaux.

Fimbriae (FIM)

Le sérotypage des isolats de *B. pertussis* était basé sur un certain nombre de protéines situées à la surface de la bactérie, appelées agglutinogènes car elles induisent la synthèse d'agglutinines (anticorps agglutinant les bactéries au cours de la maladie). Parmi ces agglutinogènes, deux fimbriae (2 et 3) ont été caractérisés : ils sont chacun composés de sous-unités identiques codées par les gènes *fim 2* et *fim 3*. Ces protéines ne joueraient pas un rôle majeur dans l'adhésion des bactéries sur les cellules de l'hôte, mais participeraient à cette étape au cours de l'infection. Ces protéines induisent la synthèse d'anticorps au cours de l'infection et après vaccination (Thomas et coll., 1989a et b ; Grimprel et coll., 1996). D'après Willems et coll. (1998), la vaccination avec ces FIM conférerait une certaine protection dans un modèle murin IN.

Hémagglutinine filamenteuse (FHA)

La FHA a été découverte par Arai et Sato (Arai et Sato, 1976 ; Sato et coll., 1983). C'est une protéine sécrétée par la bactérie, dont le gène de structure code pour une protéine de 360 kDa, mais seul un fragment de 220 kDa est sécrété et purifié. Cette protéine, outre un motif « RGD » commun aux protéines d'adhésion eucaryotes, possède plusieurs sites de fixation sur les cellules eucaryotes (Locht et coll., 1993). Il a longtemps été suggéré que cette protéine était l'adhésine majeure de *B. pertussis*. Son rôle est cependant redondant avec celui d'autres protéines sécrétées, tels les FIM, la pertactine et la toxine de pertussis. En effet, dans un modèle murin d'infection respiratoire, les mutants de *B. pertussis* déficients dans la synthèse de FHA ne sont pas éliminés plus rapidement que les souches parentales (Roberts et coll., 1991 ; Khelef et coll., 1994).

La FHA induit la synthèse d'anticorps après infection ou vaccination (Thomas et coll., 1989a et b). Les épitopes immunodominants de cette protéine ont été localisés (Leininger et coll., 1997). La vaccination avec cette protéine confère une immunité protectrice dans des modèles murins IE ou IN, mais pas IC (Sato, 1988 ; Khelef et coll., 1993a). En raison de ces résultats, de son absence de toxicité et de sa purification aisée à partir de surnageants de culture de *B. pertussis*, la FHA a été rapidement incluse dans les vaccins acellulaires.

Un problème très peu abordé jusqu'à présent est celui des réactions croisées entre les protéines bactériennes et les protéines de l'hôte. En effet, il a été montré que des vaccins contenant de la FHA induisent la synthèse d'anticorps qui reconnaissent les cellules endothéliales humaines et le fragment du complément C3bi (Prasad et coll., 1993). On ne sait pas, à l'heure actuelle, si cette observation a une importance biologique ou non.

Pertactine (PRN) ou P69

La pertactine, comme la FHA et les FIM, est une protéine sécrétée à la surface de la bactérie. C'est une protéine de 94 kDa, mais seule une protéine de 60,5 kDa, migrant anormalement sur gel comme une protéine de 69 kDa, est purifiée. Cette protéine, appelée P69, a été découverte par Novotny alors qu'il essayait de mettre au point un vaccin contre les infections à *Bordetella bronchiseptica* chez le porc, le chien et le chat (Novotny et coll., 1985a et b). Cette protéine a d'abord été purifiée à partir de suspensions bactériennes de *B. pertussis* traitées par l'acide et fut confondue avec l'adényl cyclase, en raison de sa taille sur gel et de son activité adényl cyclase. Quand les gènes de structure de cette protéine et de l'adényl cyclase ont été clonés, il a été montré qu'il s'agissait de deux protéines différentes (Glaser et coll., 1988 ; Charles et coll., 1989). Cette protéine, appelée maintenant pertactine, possède un motif « RGD » et joue un rôle important dans l'adhésion de la bactérie aux cellules eucaryotes (Leininger et coll., 1991, 1992). De plus, il a été montré que des

bactéries mutantes déficientes en PRN et en FHA sont éliminées plus rapidement que la souche parentale (Roberts et coll., 1991 ; Khelef et coll., 1994).

La pertactine induit la synthèse d'agglutinines après infection ou vaccination (Thomas et coll., 1989a et b ; Grimprel et coll., 1996). Les épitopes immunodominants ont été localisés sur la protéine (Charles et coll., 1991). C'est un antigène conférant une immunité protectrice dans les modèles murins IN (Novotny et coll., 1985a et 1985b ; Khelef et coll., 1993a). En raison de son rôle dans l'adhésion bactérienne, de son absence de toxicité et de sa purification aisée, elle fait maintenant partie de certains vaccins acellulaires.

Toxine de pertussis (PT)

Cette protéine fait partie de la famille des toxines de type A-B. Elle est aussi sécrétée par la bactérie et, outre sa capacité à induire un certain nombre des effets biologiques observés au cours de la maladie chez l'homme, elle a un rôle d'adhésine pour *B. pertussis*. La partie A est composée d'une sous-unité, S1, et la partie B, composée de cinq sous-unités (S2, S3, 2xS4 et S5), se fixe spécifiquement sur les cellules eucaryotes et permet ainsi l'entrée de la partie A (Rappuoli et Pizza, 1991). Les sous-unités S2 et S3 de la partie B possèdent des motifs ayant des homologues avec les sélectines eucaryotes, ce qui permettrait la fixation de la PT sur les cellules de l'hôte (Saukkonen et coll., 1992).

Toxines

Trois toxines sécrétées par *B. pertussis* sont maintenant bien caractérisées.

Toxine cytotrachéale (TCT)

Cette toxine est constitutivement sécrétée par la bactérie. Il s'agit d'un fragment du peptidoglycane de la bactérie, un muramyl peptide identique à celui qui est sécrété par *Neisseria*. Il agit sur l'épithélium respiratoire en détruisant le mécanisme de clairance ciliaire et en empêchant de façon durable sa réparation (Luker et coll., 1993, 1995). La TCT induirait la synthèse d'IL-1 qui activerait elle-même la synthèse de monoxyde d'azote (NO), composé particulièrement toxique pour les cellules (Heiss et coll., 1994).

Toxine de pertussis (PT)

La sous-unité S1 de la PT possède une activité ADP-ribosyl transférase (Rappuoli et Pizza, 1991). Après pénétration dans la cellule eucaryote, cette protéine inactive les protéines G impliquées dans les mécanismes de régulation cellulaire. Comment cette modification enzymatique induit-elle les effets biologiques, comme la sensibilité à l'histamine ou l'activation de la sécrétion d'insuline ? La réponse à cette question n'est pas encore connue. On sait toutefois que des mutants déficients dans l'expression de cette toxine sont incapables d'induire une infection létale chez la souris dans les modèles AE et

IN (Weiss et coll., 1983 ; Khelef et coll., 1992), ce qui a conduit à considérer la PT comme la toxine majeure synthétisée par *B. pertussis* et à l'inclure dans les vaccins acellulaires.

La PT induit la synthèse d'anticorps après infection et vaccination (Thomas et coll., 1989a et b ; Grimprel et coll., 1996). Les épitopes immunodominants ont été localisés sur les différentes sous-unités de la protéine (De Magistris et coll., 1989). C'est un antigène conférant une immunité protectrice dans des modèles murins IC, AE et IN (Sato, 1988 ; Pizza et coll., 1989 ; Khelef et coll., 1993a).

Adényl cyclase-hémolysine (AC-Hly)

Cette enzyme fait partie de la famille des toxines RTX (*Repeats in toxins*). Ces protéines sont sécrétées par la bactérie grâce à la présence de trois autres protéines. Son gène de structure fait partie d'un opéron qui comprend également ceux de ces trois protéines. Après synthèse, les toxines RTX subissent une modification post-traductionnelle (addition d'un acide gras) nécessaire à leur activation (Coote, 1992). La toxine RTX de *B. pertussis* possède, outre une activité hémolytique et invasive calcium-dépendante, une activité adényl cyclase activable par la calmoduline (Wolff et coll., 1980 ; Glaser et coll., 1988). Après fixation par son domaine hémolysine, cette protéine est capable d'entrer dans les cellules eucaryotes, d'être activée par la calmoduline et d'augmenter ainsi la concentration d'AMPc, ce qui conduit à perturber les fonctions cellulaires. Cette toxine est responsable de la mort par apoptose des macrophages alvéolaires mis en contact avec *B. pertussis* (Khelef et coll., 1993b). Ce phénomène a été mis en évidence *in vivo* grâce au modèle murin IN et dans certaines conditions de culture des bactéries (Gueirard et coll., 1998). Des mutants de *B. pertussis*, déficients dans l'expression de cette toxine, sont incapables d'induire la létalité et sont incapables de se multiplier chez l'animal (Weiss et coll., 1983 ; Khelef et coll., 1992). Les trois activités de l'AC-Hly sont nécessaires à son rôle *in vivo* (Khelef et coll., 1992).

L'AC-Hly induit la synthèse d'anticorps au cours de l'infection ou après vaccination (Arciniéga et coll., 1991 ; Grimprel et coll., 1996). C'est aussi un antigène induisant une immunité protectrice dans les modèles murins IC et IN, les épitopes immunodominants et protecteurs ont été localisés (Betsou et coll., 1993, 1995).

Cette enzyme n'a jamais été incluse dans un vaccin acellulaire en raison de sa faible expression par *B. pertussis* et de la difficulté à la purifier.

Autres adhésines et toxines

D'autres protéines de membrane externe sont en cours de caractérisation. Une nouvelle famille de protéines synthétisées par *B. pertussis* a été récemment mise en évidence. Ces protéines possèdent un domaine carboxy-terminal hautement conservé et impliqué dans la sécrétion de ces protéines.

Trois protéines possédant ce domaine sont exprimées par *B. pertussis* : la PRN, le « *Bordetella resistance serum factor* » (Brk) et le « *Tracheal colonization factor* » (Tcf) (Fernandez et Weiss, 1994 ; Finn et Stevens, 1995 ; Weiss et coll., 1997). Le facteur Brk est une protéine de 103 kDa protéolysée en 73 kDa, sécrétée et possédant deux motifs « RGD ». Le facteur Tcf est une protéine sécrétée de 68 kDa, protéolysée en 64 kDa, qui migre anormalement sur gel comme une protéine de 90 kDa a bactérie sur les cellules trachéales.

La toxine dermonécrotique (TDN), toxine thermolabile déjà décrite par Bordet et Gengou en 1909, n'est pas sécrétée par la bactérie. Elle est létale quand elle est injectée par voie intraveineuse et induit des nécroses si elle est injectée de façon sous-cutanée. Il a été montré qu'elle interfère avec la différenciation cellulaire (Horiguchi et coll., 1995). Des mutants déficients dans l'expression de cette protéine se comportent comme la souche parentale dans un modèle murin (Walker et Weiss, 1994) et son rôle dans la pathogénicité de la bactérie n'est pas très clair.

En résumé, *B. pertussis* est une bactérie pathogène respiratoire qui synthétise plusieurs adhésines (FHA, PRN, FIM, PT) et toxines (TCT, PT, AC-Hly), ce qui illustre bien la complexité des mécanismes d'adhésion et de pathogénicité bactérienne. L'analyse de toutes les protéines sécrétées par *B. pertussis* et de leur rôle au cours de l'infection a permis de mettre en évidence la coopération entre ces adhésines et ces toxines :

- la partie B de la PT, qui a une homologie avec les sélectines eucaryotes et qui se lie aux leucocytes, active l'intégrine CR3 sur qui se fixe la FHA (Saukkonen et coll., 1992) ;
- la FHA ne pourrait pas être une adhésine efficace sans interagir avec la PRN (Arico et coll., 1993) ;
- la PT agit en synergie avec l'AC-Hly pour déclencher la réaction inflammatoire pendant que la TCT détruit les cellules trachéales (Gueirard et coll., 1998).

Vaccins coquelucheux acellulaires

Différentes toxines et adhésines de *B. pertussis* constituent la base antigénique des vaccins acellulaires mis au point depuis 1970 (tableau 8.I). Il est difficile de comparer ces vaccins entre eux car les conditions de culture des bactéries, les protocoles de purification, de stockage et de détoxification des antigènes sont différents, de même que les quantités respectives des antigènes entrant dans la formulation. Cependant, l'ensemble de ces vaccins sont efficaces et induisent très peu d'effets secondaires chez le nourrisson, ce qui était un des buts recherchés.

Tableau 8.1 : Vaccins coquelucheux acellulaires mis au point depuis 1970.

Vaccin	Valence	Composantes de <i>Bordetella pertussis</i>			
		FIM	FHA	PRN	PT
Takeda (T) ¹	5	+	+++	+	+
Biken (B)	2		+		+
Amvax	1				+ ²
Pasteur-Mérieux	2		+ ³		+
SmithKline Beecham	2		+		+
	3		+	+	+
Chiron Biocine ⁴	3		+	+	+ ⁵
Connaught	5	+ ⁶	+	+	+

¹ Premiers vaccins acellulaires à être utilisés (Japon, 1980); maintenant Lederle Praxis/Takeda. ² PT détoxifiée par l'eau oxygénée et non par formaldéhyde ou glutaraldéhyde. ³ FHA native. ⁴ Doses d'antigènes très inférieures à celles contenues dans les autres vaccins acellulaires. ⁵ PT modifiée génétiquement. ⁶ FIM2 et FIM3.

Immunité après infection ou vaccination

B. pertussis a toujours été considérée comme une bactérie extracellulaire sécrétant des toxines. Seule l'immunité à médiation humorale induite après infection a été étudiée. Comme nous l'avons vu précédemment, toutes les toxines et adhésines incluses dans les vaccins acellulaires sont très immunogènes, et l'injection d'anticorps spécifiques de ces toxines et adhésines à un hôte infecté confère une protection (Brezin et coll., 1987; Sato, 1988; Granstrom et coll., 1991).

Cependant, il est connu depuis Cheers et Gray (1969) que *B. pertussis* peut persister intracellulairement chez la souris infectée. Récemment, des bactéries ont été détectées à l'intérieur de macrophages alvéolaires d'enfants immunodéprimés et atteints de coqueluche (Bromberg et coll., 1991). Par ailleurs, il a pu être montré qu'*in vitro*, *B. pertussis* peut aussi persister à l'intérieur de macrophages (De Magistris et coll., 1988; Ewanowich et coll., 1989; Friedman et coll., 1992). Enfin, Mills et coll. (1993) ont pu montrer que des souris *nude* développent des infections chroniques à *B. pertussis* et que l'inoculation à ces souris de lymphocytes T CD4⁺ provenant d'animaux convalescents permet l'élimination de la bactérie du poumon des souris infectées. Ces observations ont conduit les chercheurs à prendre en considération l'immunité à médiation cellulaire.

Deux études ont déjà été réalisées à la suite des derniers essais cliniques. Zepp et coll. (1996) ont étudié la réponse à médiation cellulaire chez des enfants immunisés par le vaccin trivalent SmithKline (FHA, PRN, PT) en primovaccination et après un rappel entre 15 et 24 mois : la réponse cellulaire spécifique induite est stable, au contraire du titre en anticorps, jusqu'à la période de

rappel. Ausiello et coll. (1997), en Italie, ont aussi mis en évidence une réponse cellulaire chez des enfants immunisés avec soit le vaccin acellulaire trivalent Chiron Biocine, soit le vaccin « germes entiers » Connaught. Cependant, la comparaison des deux vaccins signifie peu, le vaccin « germes entiers » utilisé n'étant pas efficace. Une troisième étude comparant la réponse cellulaire d'enfants immunisés par des vaccins « germes entiers » ou acellulaires vient d'être publiée (Ryan et coll., 1998). D'après les auteurs, l'immunité naturelle, comme l'immunisation par des vaccins « germes entiers », est de type TH1, tandis que l'immunité induite par les vaccins acellulaires serait plus hétérogène, impliquant des lymphocytes T sécrétant à la fois des cytokines de type 1 et des cytokines de type 2.

Questions sur les vaccins coquelucheux acellulaires

Deux problèmes principaux se sont posés concernant les vaccins acellulaires : qu'en est-il de leur efficacité clinique, et existe-t-il une interférence des vaccins acellulaires sur la réponse anti-*Haemophilus influenzae* type b (Hib) en cas d'immunisation combinée ?

L'analyse de l'ensemble de la littérature semble globalement montrer qu'en termes d'efficacité clinique, les vaccins acellulaires sont efficaces mais ont une efficacité toujours un peu inférieure à celle des vaccins « germes entiers » efficaces (Plotkin, 1997 ; Plotkin et Cadoz, 1997 ; Olin, 1997 ; Cherry, 1997 ; Lopez et Blumberg, 1997 ; Simondon et coll., 1997 ; Taranger et coll., 1997) : l'efficacité clinique des vaccins acellulaires varie de 59 % à 93 % suivant le type de vaccin utilisé, le nombre de composantes (maximum 5) et la population testée ; celle du vaccin « germes entiers » est de 95 % comme c'est le cas en France, mais peut être inférieure à 40 % comme dans le cas du vaccin Connaught.

Lors des derniers essais cliniques réalisés, il a été confirmé qu'il n'y avait pas de corrélation entre taux d'anticorps et protection induite par un vaccin (Greco et coll., 1996 ; Gustaffson et coll., 1996) alors que les anticorps jouent un rôle important. Une des hypothèses pouvant expliquer ce résultat est que les anticorps totaux mesurés par la technique ELISA ne reflètent pas les anticorps protecteurs. Comment estimer l'efficacité d'un vaccin coquelucheux ? Le modèle d'infection murin par voie intracérébrale, choisi par l'OMS pour mesurer l'efficacité des vaccins coquelucheux, a montré ses limites : les résultats obtenus avec le modèle murin d'infection respiratoire sublétales par voie intranasale (IN) semblent corrélés aux résultats obtenus lors des essais cliniques. Peut-on se servir du modèle murin IN pour tester l'efficacité des vaccins acellulaires ?

Le remplacement des suspensions bactériennes inactivées de *B. pertussis* par des protéines purifiées dans les vaccins combinés pourrait éventuellement nuire à l'immunogénicité des autres vaccins contenus dans ces combinaisons.

Il a en effet été montré que l'administration de vaccin anti-Hib avec des vaccins acellulaires affectait la réponse anti-Hib (Eskola et coll., 1996 ; Bell et coll., 1998). Cette question reste débattue dans la littérature, et si quelques auteurs retrouvent effectivement une diminution de la production d'anticorps anti-Hib, l'immunité conférée restant toutefois protectrice (Pichichero et coll., 1997 ; Lagos et coll., 1998 ; Schmitt et coll., 1998), d'autres auteurs notent des résultats globalement plus favorables à l'utilisation des vaccins acellulaires (Dagan et coll., 1997 ; Mills et coll., 1998).

D'autres questions se posent :

L'immunité induite par les vaccins « germes entiers », comme l'immunité induite par l'infection, est différente de celle induite par les vaccins acellulaires. Que signifie cette différence en termes de protection ?

Il vient d'être montré que des isolats de *B. pertussis* circulant actuellement aux Pays-Bas, où l'on a assisté récemment à une épidémie (Mooi et coll., 1998) expriment une pertactine différente de celle des isolats collectés avant l'introduction de la vaccination, ou différente de celles contenues dans les vaccins acellulaires. Ce même type d'isolats a été collecté en France où aucune épidémie n'a été observée. Une des hypothèses émises est que ces isolats ont émergé en raison de la vaccination généralisée depuis trente ans, et que les différences d'efficacité observées entre les vaccins « germes entiers » seraient dues à ces variations antigéniques. L'efficacité des vaccins acellulaires trivalents dans le modèle murin d'infection respiratoire IN contre une infection due à certains de ces isolats a été étudiée pour savoir si les vaccins acellulaires sont capables d'induire une protection contre les infections dues à tous les isolats de *B. Pertussis* (Bourseaux-Eude et coll., 1999).

Le nombre de cas de coqueluche dus à *Bordetella parapertussis* varie beaucoup d'un pays à l'autre. Il est très faible en France (2 %) mais peut être supérieur dans certains pays, comme la Finlande. Or, dans le modèle murin d'infection respiratoire IN, des protéines purifiées de *B. pertussis* protégeant contre une infection due à *B. pertussis* ne protègent pas contre une infection due à *B. parapertussis* (Khelef et coll., 1993a). Les vaccins acellulaires protégeront-ils contre les infections dues à *B. parapertussis* ?

En conclusion, les vaccins acellulaires mis au point grâce à la caractérisation des différents facteurs de virulence de *B. pertussis* sont efficaces et, à la différence du vaccin « germes entiers », induisent très peu d'effets secondaires chez le nourrisson. Etant donné la recrudescence de cas de coqueluche chez de très jeunes nourrissons contaminés par des adolescents ou de jeunes adultes, un rappel tardif est recommandé entre 11 et 13 ans : le choix s'est porté sur un vaccin acellulaire compte tenu des effets secondaires du vaccin « germes entiers » éventuellement potentialisés chez le grand enfant.

Mais, avant toute adoption dans le calendrier vaccinal français des vaccins acellulaires en primovaccination, certaines questions restent posées :

- Ces vaccins seront-ils toujours bien tolérés après plusieurs rappels ?
- La durée de l'immunité conférée par le vaccin « germes entiers » utilisé en France, dans le cadre d'un calendrier vaccinal 2-3-4 mois et rappel à 18 mois, est de 6 à 8 ans : quelle sera la durée de l'immunité avec les vaccins acellulaires ?
- Quel est le meilleur calendrier vaccinal : 2-3-4 mois, rappel à 18 mois ou 3-5-12 mois ?
- Plusieurs vaccins acellulaires vont être à notre disposition : quelle valence choisir ?
- Faut-il rajouter un autre composant, telle l'adényl cyclase-hémolysine ?
- Les vaccins acellulaires coûtent plus cher que les vaccins « germes entiers » : l'introduction des vaccins acellulaires dans le schéma vaccinal anticoquelucheux est-elle susceptible de diminuer la couverture vaccinale ?

BIBLIOGRAPHIE

ARAI H, SATO Y. Separation and characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified leukocytosis-promoting factor from *Bordetella pertussis*. *Biochem Biophys Acta* 1976, **444** : 765-782

ARCINIEGA JL, HEWLETT EL, JONHSON FD, DEFOREST A, WASSILAK S et coll. Human serologic responses to envelope-associated proteins and adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* 1991, **163** : 135-142

ARICO B, GROSS R, SMIDA J, RAPPUOLI R. Evolutionary relationship in the genus *Bordetella*. *Mol Microbiol* 1987, **1** : 301-308

ARICO B, NUTI S, SCARLATO V, RAPPUOLI R. Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90** : 9204-9208

AUSIELLO CM, URBANI F, LASALA A, LANDE R, CASSONE A. Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 1997, **65** : 2168-2174

BELL F, HEATH P, SHACKLEY F, MACLENNAN J, SHEARSTONE N et coll. Effect of combination with an acellular pertussis, diphtheria, tetanus vaccine on antibody response to Hib vaccine (PRP-T). *Vaccine* 1998, **16** : 637-642

BETSOU F, SEBO P, GUIISO N. Cya C mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 1993, **63** : 3583-3589

BETSOU F, SEBO P, GUIISO N. The C-terminal domain is essential for protective activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 1995, **63** : 3309-3515

BORDET J, GENGOU O. L'endotoxine coquelucheuse. *Annales de l'Institut Pasteur* 1909, **23** : 415-419

BORDET J, GENGOU O. Le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur* 1906, **20** : 731-741

- BOURSAUX-EUDE C, THIBERGE S, CARLETTI G, GUISO N. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine* 1999, sous presse
- BREZIN C, GUISO N, LADANT D, DJAVADI-OHANIANCE L, MEGRET F, ALONSO JM. Protective effects of anti-*Bordetella pertussis* adenylate cyclase antibodies against lethal respiratory infection in the mouse. *FEMS Lett* 1987, **42** : 75-80
- BROMBERG K, TANNIS G, STEINER P. Detection of *Bordetella pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with immunodeficiency virus infection. *Infect Immun* 1991, **59** : 4715-4719
- BROWN AM. Growth idiosyncrasies of some *Bordetella pertussis* strains, and the intracerebral virulence of these strains in mice. *J Gen Microbiol* 1959, **20** : 532-539
- CAMERON J. Variation in *Bordetella pertussis*. *J Pathol Bacteriol* 1967, **94** : 367-374
- CHARLES IG, DOUGAN G, PICKARD D, CHATFIEL S, SMITH M et coll. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.60 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86** : 3554-3558
- CHARLES IG, ROBERY M, BEESLEY K, ROMANOS M, PICKARD DJ et coll. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from *Bordetella pertussis*. *Eur J Immunol* 1991, **21** : 1147-1153
- CHEERS C, GRAY DF. Macrophage behaviour during complaisant phase of murine pertussis. *Immunology* 1969, **17** : 875-887
- CHERRY JD. Update on pertussis and diphtheria-tetanus toxoids pertussis vaccination. New strategies for clinicians. Introduction. *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16** : S76-S77
- CODY CL, BARAFF LJ, CHERRY JD, MARCY SM, MANCLARK CR. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics* 1981, **68** : 650-660
- COOTE J. Structural and functional relationships among the RTX toxins determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1992, **8** : 137-161
- DAGAN R, IGBARIA K, PIGLANSKY L, MELAMED R, WILLEMS P et coll. Safety and immunogenicity of a combined pentavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliovirus and *Haemophilus influenzae* type b-tetanus conjugate vaccine in infants, compared with a whole cell pertussis pentavalent vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16** : 1113-1121
- DE MAGISTRIS MT, ROMANO TM, NUTI S, RAPPUOLI R, TAGLIABUE A. Dissecting human T-cell responses against *Bordetella* species. *J Exp Med* 1988, **168** : 1358-1362
- DE MAGISTRIS MT, ROMANO M, BARTOLONI A, RAPPUOLI R, TAGLIABUE A. Human T cell clones define S1 subunit as the most immunogenic moiety of pertussis toxin and determine its epitope map. *J Exp Med* 1989, **169** : 1519-1532
- ESKOLA J, OLANDER RM, HOVI T, LITMANEN L, PELTOLA S, KAYHTY H. Randomised trial of the effect of co-administration with acellular pertussis DTP vaccine on immunogenicity of *Haemophilus Influenzae* type b conjugate. *Lancet* 1996, **348** : 1688-1692
- EWANOWICH CA, MELTON AR, WEISS AA, SHERBURNE RK, PEPPLER MS. Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1989, **57** : 2698-2704

- FERNANDEZ RC, WEISS AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* 1994, **62** : 4727-4738
- FINE PEM, CLARKSON JA. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* 1987, **9** : 866-883
- FINN TM, STEVENS LA. Tracheal colonization factor : a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* 1995, **16** : 625-634
- FRIEDMAN R, NORDENSSON K, WILSON L, APKORAIYE ET, YOCUM DE. Uptake of intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* 1992, **60** : 4578-4585
- GLASER P, LADANT D, SEZER O, PICHOT F, ULLMANN A, DANCHIN A. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* : cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1988, **1** : 19-30
- GOLDMAN S, HANSKI E, FISH F. Spontaneous phase variation in *Bordetella pertussis* is a multistep random process. *EMBO J* 1984, **3** : 1353-1356
- GRANSTROM M, OLINDER-NIELSEN AM, HOLMBLAD P, MARK A, HANNGREN K. Specific immunoglobulin for treatment of whooping cough. *Lancet* 1991, **338** : 1230-1233
- GRECO D, SALMASO S, MASTANTRONIO P, GIULIANO M, TOZZI A et coll. A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccines against pertussis. *N Eng J Med* 1996, **334** : 341-348
- GRIMPREL E, BEGUE P, ANJAK I, NJAMKEPO E, FRANCOIS P, GUISON N. Long-term human serum antibody responses after immunization with whole-cell pertussis in France. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996, **3** : 93-97
- GUEIRARD P, DRUILHE A, PRETOLANI M, GUISON N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun* 1998, **66** : 1718-1725
- GUISON N, CAPIAU C, CARLETTI G, POOLMAN J, HAUSERP P. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 1999, sous presse
- GUISON N, ROCANCOURT M, SZATANIK M, ALONSO JM. *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. *Microb Pathog* 1989, **7** : 373-380
- GUISON N. Isolation, Identification and characterization of *Bordetella pertussis*. *Dev Biol Stand* 1997, **89** : 379-389
- GUSTAFSSON L, HALLANDER HO, OLIN P, REIZENSTEIN E, STORSAETER J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular and a whole-cell pertussis vaccine. *N Eng J Med* 1996, **334** : 349-355
- HEISS LD, LANCASTER JR, CORBETT JA, GOLDMAN WE. Epithelial autotoxicity of nitric oxide : Role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **90** : 267-270
- HORIGUCHI Y, SENDA T, SIGIMOTO N, KATAHIRA J, MATSUDA M. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *J Cell Sci* 1995, **108** : 3243-3251

KHATTAK MN, MATTHEWS RC, BURNIE JP. Is *Bordetella pertussis* clonal ? *Br Med J* 1992, **304** : 813-815

KHATTAK MN, MATTHEWS RC. Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digests resolved by pulsed field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 1993a, **43** : 659-664

KHATTAK MN, MATTHEWS RC. A comparison of the DNA fragment patterns of the mouse-virulent challenge strains and clinical isolates of *Bordetella pertussis*. *J Infect* 1993a, **27** : 119-24

KENDRICK PL, ELDERIN G, DIXON MK, MISNER J. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine : a comparative series using intracerebral route for challenge. *Am J Public Health* 1947, **37** : 803-810

KHELEF N, SAKAMOTO H, GUISON N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required for *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathogen* 1992, **12** : 227-235

KHELEF N, DANVE B, QUENTIN-MILLET MJ, GUISON N. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* : two immunologically distinct species. *Infect Immun* 1993a, **1** : 486-490

KHELEF N, ZYCHLINSKI A, GUISON N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages : role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 1993b, **61** : 4064-4071

KHELEF N, BACHELET CM, VARGAFTIG BB, GUISON N. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in toxins and adhesins. *Infect Immun* 1994, **62** : 2893-2900

LAGOS R, KOTLOFF K, HOFFENBACH A, SAN MARTIN O, ABREGO P et coll. Clinical acceptability and immunogenicity of a pentavalent parenteral combination vaccine containing diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliomyelitis and *Haemophilus influenzae* type b conjugate antigens in two-, four- and six-month-old Chilean infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998, **17** : 294-304

LEININGER E, ROBERTS M, KENIMER JG, CHARLES IG, FAIRWEATHER N et coll. Pertactin, an Arg-Gly-Asp containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence to mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88** : 345-349

LEININGER E, EWANOVICH CA, BARGHAVA A, PEPPLER MS, KENIMER JG, BRENNAN MJ. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 1992, **60** : 2380-2385

LEININGER E, BOWEN S, RENAULD-MONGENIE G, ROUSE JH, MENOZZI FD et coll. Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J Infect Dis* 1997, **175** : 1423-1431

LOCHT C, BERTIN P, MENOZZI FD, RENAULD G. The filamentous hemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* 1993, **9** : 653-660

LOPEZ AL, BLUMBERG DA. An overview of the status of acellular pertussis vaccines in practice. *Drugs* 1997, **54** : 189-196

LUKER KE, COLLIER JL, KOLODLIEJ EW, MARSHAL GR, GOLDMAN WE. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides : distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90** : 2365-2369

LUKER KE, TYLER AN, MARSHALL GR, GOLDMAN WE. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microb* 1995, **16** : 733-743

MADSEN T. Vaccination against whooping cough. *JAMA* 1933, **101** : 187-188

MILLS KH, BARNARD A, WATKINS J, REDHEAD K. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis* : role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immun* 1993, **61** : 399-410

MILLS E, GOLD R, THIPPHAWONG J, BARRETO L, GUASPARINI R et coll. Safety and immunogenicity of a combined five-component pertussis-diphtheria-tetanus-inactivated poliomyelitis-*Haemophilus b* conjugate vaccine administered to infants at two, four and six months of age. *Vaccine* 1998, **16** : 576-585

MOOI F, VAN OIRSCHOT H, HEUVELMAN K, VAN DER HEIDE HGJ, GAASTRA W, WILLEMS RJL. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands : temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998, **66** : 670-675

MUSSER JM, HEWLETT EL, PEPPLER MS, SELANDER RV. Genetic diversity and relationships in *Bordetella* species. *J Bacteriol* 1986, **30** : 230-237

NOVOTNY P, KOBISH M, COWNLEY K, CHUBB AP, MONTARAZ JA. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 1985a, **50** : 190-198

NOVOTNY P, CHUBB AP, COWNLEY K, MONTARAZ JA. Adenylate cyclase activity of a 68,000-molecular-weight protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1985b, **50** : 199-206

OLIN P, RASMUSSEN F, GUSTAFSSON L, HALLANDER HO, HEIJBEL H. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet* 1997, **350** : 1569-1577

OLIN P. Commentary : the best acellular pertussis vaccines are multicomponent. *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16** : 517-519

PARKER CD. The genetics and physiology of *Bordetella pertussis*. In : Third International Symposium of Pertussis 1980 : 65-69

PICHICHERO ME, LATIOLAIS T, BERNSTEIN DI, HOSBACH P, CHRISTIAN E et coll. Vaccine antigen interactions after a combination diphtheria-tetanus toxoid-acellular pertussis/purified capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid vaccine in two-, four- and six-month-old infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16** : 863-870

PITTMAN M. Pertussis toxin : the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis* 1979, **1** : 401-412

PIZZA M, COVACCI A, BARTOLONI A, PERUGINI M, NENCIONI L et coll. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 1989, **246** : 497-500

PLOTKIN SA, CADOZ M. The acellular pertussis vaccine trials : an interpretation. *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16** : 508-17

PLOTKIN SA. The effectiveness of whole-cell pertussis vaccines. *Dev Biol Stand* 1997, **89** : 171-174

PRASAD SM, YIN Y, RODZINSKI E, TUOMANEN EI, MASURE HR. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993, **61** : 2780-2785

RAPPUOLI R, PIZZA M. Structure and evolutionary aspects of ADP-ribosylating toxins. *In* ; Source book of bacterial proteins toxins. ALOUF J, Eds Acad Press 1991, 1-20

ROBERTS M, FAIRWEATHER NF, LEININGER E, PICKARD D, HEWLETT EL et coll. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* lacking the *vir*-regulated P.69 outer membrane protein. *Mol Microbiol* 1991, **5** : 1393-1404

ROMANUS V, JONSELL R, BERQUEST SO. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr Infect Dis J* 1987, **6** : 364-371

RYAN M, MURPHY G, RYAN E, NILSSON L, SHACKLEY F et coll. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology* 1998, **93** : 1-10

SATO Y, COWELL JL, SATO H. Separation and purification of the haemagglutinins from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1983, **41** : 313-320

SATO Y. Animals models of pertussis. *In* : Pathogenesis and immunity in pertussis, WARDLAW AC and PARTON R Eds. John WILEY and sons Inc., 1988 : 309-325

SAUKKONEN K, BURNETTE WN, MAR VL, MASURE HR, TUOMANEN EI. Pertussis toxin has eucaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89** : 118-122

SCHMITT HJ, VON KONIG CH, NEISS A, BOGAERTS H, BOCK HL et coll. Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *JAMA* 1996, **275** : 37-41

SCHMITT HJ, ZEPP F, MUSCHENBORN S, SUMENICHT G, SCHUIND A et coll. Immunogenicity and reactogenicity of a *Haemophilus influenzae* type b tetanus conjugate vaccine when administered separately or mixed with concomitant diphtheria-tetanus-toxoid and acellular pertussis vaccine for primary and for booster immunizations. *Eur J Pediatr* 1998, **157** : 208-214

SIMONDON F, PREZIOSO MP, YAM A, TOURE KAKE C, CHABIRAND L et coll. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine* 1997, **15** : 1606-1612

STAINER DW. Growth of *Bordetella pertussis*. *In* : Pathogenesis and Immunity in Pertussis, WARDLAW AC and PARTON R Eds. John WILEY and sons Inc., 1988 : 19-37

STANDFAST AFB. The comparison between field trials and mouse protection tests against intranasal and intracerebral challenges with *Bordetella pertussis*. *Immunology* 1958, **2** : 135-143

TARANGER J, TROLLFORS B, LAGERGARD T, LIND L, SUNDH V et coll. Unchanged efficacy of a pertussis toxoid vaccine throughout the two years after the third vaccination of infants. *Pediatr Infect Dis J* 1997, **16** : 180-184

THOMAS MGK, REDHEAD K, LAMBERT HP. Human serum antibody responses to *Bordetella pertussis* infection and pertussis vaccination. *J Infect Dis* 1989a, **159** : 211-218

THOMAS MGK, ASHWORTH, MILLER E, LAMBERT HP. Serum IgG, IgA and IgM responses to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and agglutinogens 2 and 3 after infection with *Bordetella pertussis* and immunization with whole-cell pertussis vaccine. *J Infect Dis* 1989b, **159** : 838-845

VAN DER ZEE A, VERNOOIJ S, PEESTERS M, VAN EMBDEN J, MOOI F. Dynamics of the population structure of *Bordetella pertussis* as measured by IS 1002-associated RFLP : comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. *Microbiology* 1996, **142** : 3479-3475

WALKER KE, WEISS AA. Characterization of the dermonecrotic toxin in the members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun* 1994, **62** : 3817-3826

WEBER C, BOURSOUX-EUDE C, NJAMKEPO E, GUISON N. En préparation

WEISS AA, HEWLETT E, MYERS GA, FALKOW S. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1983, **42** : 33-41

WEISS AA, FERNANDEZ RC, MINK CM. Bactericidal activity of human serum against *Bordetella pertussis*. In : 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1997, Abst B-317

WILLEMS RJL, KAMERBEEK J, GEUIJEN CAW, TOP J, GIELEN H et coll. The efficacy of a whole-cell pertussis vaccine and fimbriae against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in a respiratory mouse model. *Vaccine* 1998, **16** : 410-416

WOLFF J, COOK GH, GOLDHAMMER AR, BERKOWITZ SA. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, **77** : 3841-3844

WOODS DE, FRANKLIN R, CRYZ SJ, GANSS M, PEPPLER M, EWAVI WICH C. Development of a rat model for respiratory infection with *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1989, **57** : 1018-1024

ZEPP F, KNUF M, HABERMEHL P, SCHMITT HJ, REBSCH C et coll. Pertussis-specific cell-mediated immunity in infants after vaccination with a tricomponent acellular pertussis vaccine. *Infect Immun* 1996, **64** : 4078-4084